Lane Medical Library

Aus der wissenschaftlichen Abteilung der Pharmagans, Pharmaceutisches Institut Ludwig Wilhelm Gans, Oberursel (Taunus)
(Vorstand: Prof. Dr. Paul Hirsch)

STANFORD UNIVERSITY OCT 27 1930

Zur Auswahl der Impftiere bei der Gewinnung von Hammelblutlysinen von Kaninchen

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Tierärztlichen Fakultät der Universität München

vorgelegt von

Karl Franta
Tierarzt und Tierzuchtassessor aus München

Jena
Gustav Fischer
1930

Aus der wissenschaftlichen Abteilung der Pharmagans, Pharmaceutisches Institut Ludwig Wilhelm Gans, Oberursel (Taunus)
(Vorstand: Prof. Dr. Paul Hirsch)

Zur Auswahl der Impftiere bei der Gewinnung von Hammelblutlysinen von Kaninchen

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Tierärztlichen Fakultät der Universität München

vorgelegt von

Karl Franta
Tierarzt und Tierzuchtassessor aus München

Jena
Gustav Fischer
1930

Gedruckt mit Genehmigung der Fakultät.

Referent: o. ö. Univ.-Prof. Dr. W. Ernst.

Abdruck aus der
Zeitschrift für Immunitätsforschung und experimentelle Therapie.
Bd. 66. 1930.
Verlag von **Gustav Fischer** in **Jena.**

Wer immer sich mit der Immunisierung von Tieren zum Zweck der Serumgewinnung befaßte, mußte erfahren, daß auch die beste, erprobteste Methode sich nicht so bewährte, daß 100 Proz. der behandelten Tiere die erwünschte Titerhöhe erreichten. Gerade bei der Herstellung des „hämolytischen Ambozeptors" treten eine große Anzahl von Minusvarianten in Erscheinung. Ich hatte es mir als Aufgabe gestellt, durch geeignete Methoden den Prozentsatz der entsprechend reagierenden Tiere zu erhöhen. Im Gegensatz zu den zahlreichen Versuchen, einen besseren Impfmodus zu finden, suchte ich das Ziel durch Auswahl unter den zur Verfügung stehenden Tieren zu erreichen. Bevor ich diese Versuche schildere, mache ich die notwendigen Angaben über Impfmethode und Prüfung der Sera:

Die Versuchskaninchen erhielten am 1., 4. und 7. Tag je 3½ ccm einer 20proz. Aufschwemmung gewaschener Hammelblutkörperchen intravenös; die Prüfung dauerte meistens vom 11.—13. Tag. Vielfach wurde die erwünschte Titerhöhe schon am 11. Tag erreicht. Es wurde dann der Versuch um 2 Tage früher abgeschlossen. Uebrigens konnte ich bei den nicht so günstig reagierenden Tieren feststellen, daß eine Titersteigerung nach dem 11. Tag in der Mehrzahl der Fälle nicht eintrat.

Zur Prüfung der Sera wurden verwandt eine 5proz. Aufschwemmung gewaschener Hammelblutkörperchen und 10proz. Lösung von frischem Meerschweinchenserum in physiologischer Kochsalzlösung als Komplement je 0,5 ccm. Die absteigenden Konzentrationen des ½ Stunde bei 55—56° inaktivierten

Kaninchenserums wurden dadurch erzielt, daß fallende Mengen einer 6000-fachen Verdünnung eingefüllt wurden. So entspricht die Menge von

1,5 ccm	1 ccm	0,75 ccm	0,6	0,5	0,4
		einer Verdünnung von			
1:2000	3000	4000	5000	6000	7500

da ja mit halben Dosen gearbeitet wurde.

Zu Beginn des Versuches kam in jedes Gläschen soviel Kochsalzlösung als zur Gesamtmenge von 2,5 ccm fehlte. Bei schlecht lösenden Seren ging ich von stärkeren Konzentrationen des Serums aus. War der Titer 1:4000 erreicht, d. h. war nach 20 Minuten dauernder Erwärmung im Wasserbad bei 37° C in dem mit 0,75 ccm der 6000fachen Serumverdünnung beschickten Röhrchen vollkommene Hämolyse eingetreten, so wurde die Prüfung des betreffenden Serums (Kaninchens) abgeschlossen.

Bei der oben angeführten Vorbehandlung von Kaninchen des zum Teil vorgefundenen, zum Teil frisch angekauften Bestandes ergab sich bei graphischer Darstellung der Resultate sehr bald eine zweigipflige Kurve. Die beiden Gipfel befanden sich beim Titer von 1:1000 bzw. 1:4000.

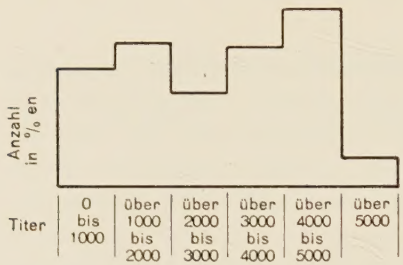

Fig. 1.

Es war dies ein Hinweis, daß die verschiedene Reaktionsfähigkeit vielleicht erblich bedingt sei und zwei allelomorphe Gene Ursache der beiden Kurvengipfel seien. Nach Johannsens Elementen der exakten Erblichkeitslehre liegt die Vorstellung am nächsten, daß Mehrgipfligkeit durch die Anwesenheit verschiedener Biotypen verursacht wird. Ich versuchte daher, durch Paarung hochwertiger Tiere (die Blutentnahme durch Herzpunktion brachte den Verlust manches auserwählten Kaninchens mit sich) den Prozentsatz der vorteilhaft reagierenden Nachkommen zu erhöhen.

Ich konnte in der Literatur keine Angaben über planmäßige Züchtung von Serumtieren finden. Die Arbeiten über Vererbung der Immunität [s. Handbuch der pathogenen Mikroorganismen (1)] stehen fast ausschließlich unter dem Einfluß der lamarckistischen Theorie von der Vererbung erworbener Merkmale. Es handelt sich also dabei um den Einfluß der an den Eltern, besonders an der Mutter, vorgenommenen Impfungen auf die Immunität oder den

Antikörpergehalt des Blutes der Nachkommenschaft. Bei meinen Versuchen ist zunächst nur von der Vererbung der Bereitschaft, Antikörper zu bilden, die Rede; auf die Möglichkeit sogenannter Nachwirkungen, also Steigerung des Titers infolge Vorbehandlung der Eltern, will ich erst später eingehen. Ueber die Vererbung einer solchen Bereitschaft liegen Untersuchungen von L. Hirszfeld vor. Er stellte Versuche an über die erbliche Uebertragung der Schick-Reaktion und kam zu dem Schluß, daß sich die Kinder Schick-positiver Eltern besonders schwer gegen Diphtherie immunisieren lassen, nach durchgemachter Erkrankung infolge mangelnder Antitoxinbildung Schick-positiv bleiben und infolgedessen leicht rückfällig werden. H. und L. Hirszfeld (2) nehmen auf Grund ihrer umfangreichen Untersuchungen an, daß die Ab- und Anwesenheit normaler Antikörper (davon wird später die Rede sein) sowie deren Vermehrungstempo die Funktion einer Anlage sein können. Von einer Fassung der Erbformel sei man aber noch weit entfernt. P. A. Lewis und D. Loomis (3) konnten feststellen, daß die Fähigkeit der Hämolysinbildung bei Meerschweinchen wenigstens zum Teil auf konstitutionelle, vererbbare Eigenschaften zurückzuführen sei. Es wurden 4 Familien mit zusammen etwa 30 Tieren untersucht. Je 2 Familien zeichneten sich durch größeres bzw. geringeres Hämolysinbildungsvermögen aus. Die Unterschiede traten weniger deutlich hervor, wenn größere oder wiederholte Antigengaben zugeführt wurden. Eine erbanalytische Untersuchung wurde nicht durchgeführt. Es ist auch nichts über die Verwandtschaftsverhältnisse angegeben. In einer Arbeit von Franz Wolf (4) über den Verlauf der Antikurve nach iv. Injektion von gewaschenen Rindererythrozyten heißt es: „es scheint der Verlauf der A. K.-Kurve in quantitativer Beziehung bei blutsverwandten gleichaltrigen Tieren ein einheitlicher und somit eine familiencharakteristische Eigenschaft zu sein". W. standen allerdings nur 3 Würfe zu je 3 Kaninchen zur Verfügung.

Mein Ausgangsmaterial waren ausschließlich Kaninchen unbekannter Herkunft, Rassenmischlinge verschiedener Wüchsigkeit, die den erwünschten Titer 1:4000 überschritten bzw. fast erreicht hatten. Ob und wie diese Impfreaktion genotypisch bedingt war, war mir natürlich gänzlich unbekannt.

Als Zuchttiere wurden Kaninchen aus einheitlich guten Würfen bevorzugt (Mindesttiter 1:3000), da bei brauchbaren Individuen

ungleichmäßiger Würfe die Möglichkeit des heterozygoten Auftretens der erwünschten Merkmale größer erschien. Einerseits wurde der Versuch gemacht, durch engste Inzucht das homozygote Auftreten der günstigen Gene zu erzielen, andererseits wurde bei den Paarungen wieder darauf gesehen, daß möglichst viele miteinander nicht verwandte hochwertige Tiere in den Ahnentafeln vorzufinden waren, damit allenfalls eine Addition gleichsinniger, titersteigender Gene stattfinden könne.

Die Ergebnisse des Zuchtversuches sind in der Tabelle I niedergelegt:

Tabelle I.

Immuntiter	I		II		III		IV		V		VI	
	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
1: < 1000	40	16,67	8	3,52	8	4,35	0	0,00	0	0,00	0	0,00
1: 1000	47	19,58	26	11,45	20	10,87	12	15,79	7	8,54	4	7,55
1: 2000	33	13,75	38	16,74	28	15,22	11	14,47	16	19,51	6	11,32
1: 3000	46	19,17	55	24,23	46	25,00	15	19,74	25	30,49	16	30,19
1: 4000	62	25,83	79	34,81	68	36,95	32	42,11	28	34,14	21	30,62
1: 5000 u. weniger	12	5,00	21	9,25	14	7,61	6	7,89	6	7,32	6	11,32

Tabelle II.

	%	%	%	%	%	%
1: < 2000	36,25 (± 3,103)	14,97[1] (± 2,368)	15,22[1] (± 2,646)	15,79[1] (± 4,188)	8,54[1] (± 3,090)	7,55[1] (± 3,629)
1: 3000 u. weniger	50,00 (± 3,227)	68,29[1] (± 3,089)	69,56[1] (± 3,389)	67,74[1] (± 5,269)	71,95[1] (± 4,964)	81,13[1] (± 5,374)
1: 4000 u. weniger	30,83 (± 2,981)	44,06[2] (± 3,295)	44,56[2] (± 3,661)	50,00[2] (± 5,735)	41,46 (± 5,440)	50,94[2] (± 6,867)

1) Die Differenz zwischen diesem Wert und dem entsprechenden in Spalte I ist reell.

2) Die Differenz zwischen diesem Wert und dem entsprechenden in Spalte I erreicht fast das Dreifache ihres mittleren Fehlers.

Spalte I Kaninchen unbekannter Abstammung.
„ II alle auf Leistung gezüchteten Kaninchen.
„ III „ „ Stammutter 198 zurückgehenden Kan.
„ IV „ „ „ „ in gezüchteten Kan.
„ V „ Nachkommen aus gleichmäßig guten Würfen.
„ VI wie V, aber ohne Nachkommen von 879 und Geschwistern.

Spalte 1 enthält die Ergebnisse nach Behandlung des Bestandes von 240 Tieren gänzlich unbekannter genotypischer Zusammensetzung, Spalte 2 die mit 227 auf Leistung gezüchteten Kaninchen erzielten Titer, Spalte 3 registriert

alle von der Stammutter 189 stammenden, Spalte 4 alle auf dieses Tier ingezüchteten Nachkommen; Spalte 5 enthält die Tiere, deren sämtliche Ahnen aus gleichmäßig hochwertigen Würfen stammen (Titer mindestens 1:3000) Davon fehlen in Spalte 6 alle von der Häsin 879 und deren Geschwistern abstammenden Tiere. Die Erbmasse dieses Wurfes enthielt unserem Versuch entschieden abträgliche Faktoren.

Ein Blick auf die Tabelle zeigt sofort, daß durch die planmäßige Zucht eine Verschiebung im Sinne einer Erhöhung des mittleren Titerwertes stattgefunden hat. Der erste Gipfel beim Titer 1:1000 ist scheinbar verschwunden. Die Einsenkung wird durch die dem Mittelwert zuneigenden Varianten der beiden Reaktionstypen ausgefüllt. Wir sehen ein allmähliches Ansteigen bis zur meist vertretenen Gruppe 1:4000 mit nachfolgendem jähem Abfall der Kurve. Das Fehlen der Titer unter 1:1000 in einigen Spalten ist wahrscheinlich auf die kleinere Anzahl der Versuchstiere zurückzuführen. Die Züchtung eines „Ueberkaninchens" ist weder durch Inzucht noch durch das Zusammenführen der verschiedenen Blutströme geglückt. In allen Gruppen befinden sich vereinzelte Tiere, deren Serum in den Verdünnungen von 1:6000 bis 1:10000 noch völlig löste.

In Tabelle II werden die Zahlenwerte nochmals dargestellt, bearbeitet nach den Regeln der Kollektivmaßlehre. Es werden dadurch alle durch zu geringe Anzahl der Versuchstiere entstandenen Fehler ausgeglichen. Eine reelle Differenz zweier Werte ist dann vorhanden, wenn der mittlere Fehler nicht größer ist als ein Drittel der Differenz selbst. Ich folge darin den Angaben in Johannsens „Elementen der exakten Erblichkeitslehre". Den mathematischen Anforderungen genügen nur wenige der vorgefundenen Differenzen. Nachweisbar geglückt ist es, durch Zuchtwahl die Zahl der unter der Titerhöhe 1:2000 bleibenden Tiere bedeutend zu verringern, die Zahl der 3000fach und höher lösenden Tiere wesentlich zu vermehren. Die Differenzen zwischen den Prozentzahlen der auf mindestens 4000 kommenden Tiere sind durchweg ein wenig höher als das 3fache ihrer mittleren Fehler, müssen also etwas mit Vorsicht beurteilt werden. Von den Differenzen zwischen den einander entsprechenden Gruppen der Spalten 2—6 der Tabelle I ist keine einzige reell im Sinne der Kollektivmaßlehre. Trotzdem sei darauf hingewiesen, daß die auf No. 198 ingezogenen Tiere zu 50,0 Proz. die 4000er Grenze überschritten haben; den höchsten Wert mit 50,94 Proz. erreichte der in Spalte 6 verzeichnete Bestand.

Mit diesen Ergebnissen meines Zuchtexperimentes mußte ich mich einstweilen begnügen.

Der Titer 1:4000 stellt bei dem angewandten Impfmodus eine Art Grenzwert dar, der selten überschritten wird. Die Zuchtwahl erhöhte die Zahl der diesem Wert nahekommenden Varianten. Ob es sich um wahre Vererbung oder nur um „Nachwirkungen" handelt, kann nicht direkt entschieden werden, da ja nur vorbehandelte Tiere zur Zucht verwandt wurden. Für wahre Vererbung spricht der rasche Titerabfall, der oft am 13. Tage schon ganz beträchtlich ist. Wenn dann solche Tiere ½ Jahr und länger nach der Impfung hochwertige Nachkommen erzeugen, so wird eine Nachwirkung nicht sehr wahrscheinlich. Gegen die Nachwirkungen spricht auch der je nach den Blutlinien sehr wechselnde Erfolg der planmäßigen Züchtung. Es befanden sich unter den 33 Kindern und Enkeln der Mutter (879) nur 7 = 21,21 Proz. mit dem Titer 1:4000, 18 = 54,55 Proz. blieben unter der 3000er Grenze. Der Mittelwert liegt also unter dem beim Bestande unbekannter Herkunft, obwohl immer nur phänotypisch hochwertige Individuen gepaart wurden. Wenn es sich also wirklich um Nachwirkungen handelt, so traten diese nur in bestimmten Familien auf, sie waren also doch genotypisch verursacht.

Die noch sehr beträchtliche Anzahl von Minusvarianten veranlaßte mich, nach Mitteln zu ihrer schnelleren Ausmerzung zu suchen; die Unmöglichkeit, bei gegebenem Impfmodus wesentlich über den Titer 1:4000 hinauszukommen, zwang mich, danach zu forschen, ob vielleicht gerade bei hochgezüchteten Tieren hemmende Einflüsse auftreten, welche eine weitere Steigerung des Serumwertes verhindern. Ich begann zunächst den Normaltiter der Kaninchen zu prüfen, und zwar den Gehalt des inaktivierten Serums an Hämolysinen. Ich tat dies aus zwei Gründen. Erstens liegen verschiedene Arbeiten vor über den Zusammenhang zwischen dem normalen Antikörpertiter und der Immunisierbarkeit. So fand ich mehrere Angaben darüber (5), daß sich Pferde mit hohem Diphtherieantitoxintiter besonders gut zur Diphtherieserumgewinnung eignen. Da das Serum älterer Pferde gewöhnlich mehr Normalantitoxin enthält, paßt hierzu sehr gut der Rat einiger Immunisatoren, Pferde mit mindestens 10—12 Jahren zu diesem Zwecke zu verwenden.

St. Baecher (6) nennt den „natürlichen" Antitoxintiter einen Indikator für die Aussichten der „künstlichen" Immunisierung. Er schreibt: „Wenig ist

über die Voraussetzungen bekannt, die durch die individuellen Eigenschaften des Serumspenders gegeben sind, und doch weiß jeder auf diesem Gebiete praktisch Tätige, in wie hohem Grad dieser Faktor unter sonst gleichen Bedingungen das Ergebnis einer Immunisierung bestimmen kann."

W. Doelter (7), L. Hirszfeld und W. Halber (8) stellten fest, daß nur solche Kaninchen, welche schon normale Agglutinine gegen die menschliche Blutgruppe A aufwiesen, auf unspezifische oder spezifische Behandlung mit Agglutininbildung, d. h. -vermehrung reagierten.

H. und L. Hirszfeld (2) sind der Ansicht, daß die verschiedenen Normalantikörper bzw. die Produktionsfähigkeit verschiedener Antikörper von verschiedenen Genen ausgehe, es handele sich um relativ unabhängige konstitutionelle Eigenschaften.

E. Witebsky (9) konnte nachweisen, daß die Erzeugung gruppenspezifischer Antisera vom Kaninchen von der Konstitution des Impftieres abhängt. „Maßgebend ist das Fehlen oder Vorhandensein gruppenspezifischer Qualitäten in den Organen" (nachgewiesen durch Komplementbindungsreaktion unter Verwendung von alkoholischen Organextrakten und Anti-A-Serum) „als deren sekundärer Ausdruck die Präformation des Normalantikörpers im Serum erscheint."

Die Vererbbarkeit des normalen Diphtherieantitoxintiters war der zweite Grund meines Versuchs. H. und L. Hirszfeld (2) teilen mit, daß die Kinder zweier Schick-positiver Eltern stets Schick-positiv waren. Von 228 Kindern Schick-negativer Eltern waren 71 Proz. Schick-negativ. Aehnliche Ergebnisse hatten sie bei den Versuchen über die Vererbung des Dick-Testes. Die Kinder zweier Dick-positiver Eltern litten ebenfalls Mangel an Antikörpern gegen das Streptokokkentoxin, Dick-negative Eltern hatten zu 62 Proz. Dick-negative Kinder. Bezüglich des Dick-Testes bei Kindern negativer Eltern liegen allerdings nur 50 Beobachtungen vor. Von der negativen Seite her betrachtet, also bezüglich der Vererbbarkeit des Antitoxinmangels, sind die Versuche jedenfalls überzeugend, wenn auch, wie Hirszfeld selbst angibt, die serologische Unreife jüngster Individuen Ursache des Antitoxinmangels sein kann.

Die Vorprüfung der inaktivierten Kaninchensera erfolgte in der Weise:

Fallende Mengen des Normalambozeptors (0,5 0,2, 0,1, 0,05, 0,02, 0,01 usw.) wurden mit NaCl-lösung auf das Volumen 1,5 ccm ergänzt und dann mit 0,5 ccm $^1/_{10}$ verdünnten Meerschweinchenkomplements und 0,5 ccm 1proz. Hammelerythrozytenaufschwemmung versetzt. Ich wählte eine 1proz. Suspension, weil dann mit 0,5 ccm Kaninchenserum bei sämtlichen Versuchen eine, wenn auch zum Teil sehr geringe, so doch wahrnehmbare Lösung erzielt und eine Häufung der Fälle, in denen bei der Höchstdosis keine komplette

Lösung eintrat, vermieden werden konnte. Bei 5proz. Aufschwemmung wäre dies der Fall gewesen. Umgekehrt ist die Ablesung leichter Trübungen bei Anwendung 0,5proz. Suspension bereits etwas erschwert. Ich überzeugte mich, daß die zur völligen Hämolyse notwendige Serumdosis auch innerhalb dieses Titerintervalls von der Menge der Blutkörperchen linear abhängt. Die lösende Dosis 0,1 entspricht also einer Lösung durch 0,5 ccm Serum bei Verwendung einer 5proz. Suspension und damit dem Titer $^1/_1$. 0,01 entspricht dem Titer $^1/_{10}$ usw.

Der Normaltiter ist Schwankungen unterworfen. Insbesondere fällt auf, daß junge Tiere einen sehr geringen Serumwert aufweisen. Von 57 Kaninchen im Alter von etwa 3 Monaten hatten nur 4 den Titer $^1/_1$ bzw. ½. H. und L. Hirszfeld (2) haben die gleiche Erscheinung bei Beobachtung des Schick-Testes beschrieben. Sie führen, wie bereits erwähnt, die Schick-Positivität junger Kinder zum Teil auf serologische Unreife zurück. Die Reifung des Hämolysintiters ist in vereinzelten Fällen schon mit 3 Monaten beendet, ich sah aber bis zum 6. Monat noch Titererhöhung eintreten. Es wurden auch Abnahmen bei Untersuchungspausen von etwa 4 Wochen festgestellt. Um von diesen Schwankungen unabhängig zu sein, habe ich bei Vergleich des Normaltiters mit dem nach der Impfung immer den letzten Wert, der kurz vor der Immunisierung notiert wurde, verwandt. Vorher hatte ich 6 Kaninchen an 4 aufeinanderfolgenden Tagen auf den Hämolysingehalt geprüft und dabei nur sehr geringe Schwankungen beobachtet. Es entspricht dies auch den in der Literatur vorgefundenen Angaben. So haben Hahn und Neu (10) bei täglich wiederholter Blutentnahme zwar eine beträchtliche Steigerung des bakteriziden Titers gegen Typhusbakterien und Staphylokokken festgestellt (sie führen dies auf den Uebertritt der an Leukinen reichen Lymphe ins Blut zurück). Der hämolytische Titer blieb aber unverändert. Zum gleichen Ergebnis kam Sacerdoti (Arch. Science med., T. 32, 1909.)

Nach diesen Vorarbeiten begann ich mit der vergleichenden Titerprüfung vor und nach der Impfung. Tabelle III enthält den ausführlichen Befund. Die 1. Spalte zeigt die bei weitem geringsten Titerwerte. 9 Fälle mit dem Titer 1:4000 beweisen aber, daß ein sehr niedriger Normalwert eine gute Immunisierbarkeit nicht sicher ausschließen läßt. Bis zum Normaltiter ½ sehen wir steigende Tendenz des Immuntitermittelwertes. Dann tritt wieder ein Rückschlag ein und erst bei den höchsten Werten (10fach und darüber) zeigt sich wieder das deutliche Ueberwiegen der erwünschten End-

Tabelle III.

Immuntiter	Normalambozeptortiter									
	$>2/1$	$2/1$	$3/2$	$1/1$	$3/4$	$1/2$	$7/20$	$1/5$	$1/10$	höchstens $1/20$
1:< 1000	3	2	2	5	1	3	2	6	—	—
1:1000	12	5	3	9	4	1	3	3	3	—
1:2000	7	1	7	5	4	7	1	3	2	—
1:3000	8	7	8	18	9	10	2	5	2	4
1:4000	9	9	2	14	13	14	5	12	4	4
1:5000 u. weniger	—	—	1	5	1	3	1	1	1	1

in Gruppen zusammengefaßt:

	I $>1/1$		II $1/1$—$1/2$		III $<1/2$		IV = II + III $1/1$ u. weniger	
	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%	Anzahl	%
1:< 1000	7	8,14	9	7,14	8	12,31	17	8,90
1:1000	20	23,26	14	11,11	9	13,85	23	12,04
1:2000	15	17,44	16	12,70	6	9,23	22	11,52
1:3000	23	26,74	37	29,36	13	20,00	50	26,18
1:4000	20	23,26	41	32,55	25	38,46	66	34,56
1:5000 u. weniger	1	1,16	9	7,14	4	6,15	13	6,80

Tabelle IV.

	%	%	%	%
1:< 2000	31,40 (± 5,005)	18,25 (± 3,441)	26,16 (± 5,451)	20,94 (± 2,944)
1:3000 u. weniger	51,16 (± 5,390)	69,05 (± 4,118)	64,61 (± 5,931)	67,54 (± 3,311)
1:4000 u. weniger	24,42 (± 4,633)	39,69(±4,359)[1])	44,61(±6,166)[1])	41,36(±3,563)[1])

Die Differenzen erreichen in keinem Falle das 3fache ihrer mittl. Fehler, jedoch ist diese Bedingung annähernd erfüllt beim Vergleich der mit [1]) bezeichneten Werte mit dem entsprechenden in Spalte I.

titer. Vielleicht hätte eine erheblich größere Versuchsreihe erwiesen, daß der Unterschied zwischen der ersten und den letzten Spalten nicht zufällig ist. Variationsstatistisch nachweisbar ist er nicht. In Tabelle IV sind die zu Gruppen zusammengefaßten Längsreihen der Tabelle III analog der Tabelle II verzeichnet. Ein Unterschied zwischen den Werten der Spalte 1 und denen der Spalten 2 und 3 ist unverkennbar. Aber nicht einmal durch Zusammenfassung der Spalten 2 und 3 in Spalte 4 ist auch nach den Regeln der Kollektivmaßlehre eine positive Korrelation zwischen der Normal- und Immuntiterhöhe nachweisbar (Tabelle IV). Von einer Korrelation $= +1$ sind wir sehr weit entfernt.

Trotzdem kann der positive Wert in Wirklichkeit viel größer sein. Wir wollen uns auf den Standpunkt der Sahlischen Lehre stellen, nach welcher die Bindung des Normalantikörpers an das Antigen eine Verarmung des Blutes an diesen Antistoffen hervorruft, wodurch der Reiz zum Ersatz und zur Ueberproduktion entsteht. Wenn wir von den Veränderungen, welche das Hammelblut nach der Einspritzung im Kreislauf des Kaninchens erleidet, vorläufig ganz absehen, so ist doch kein Zweifel, daß eine geringere Normalantikörpermenge rascher an das Antigen adsorbiert wird. Mit fallender Konzentration des zu adsorbierenden Stoffes steigt die relative Adsorption, das ist der Quotient zwischen dem adsorbierten Anteil als Dividend und dem freien Rest als Divisor. In unserem Falle wäre also wohl denkbar, daß zwar der Gehalt an Normalhämolysinen maßgebend für die Impfreaktion ist, daß aber bei zunehmender Konzentration des Antikörpers die relative Verarmung des Blutes an diesem Stoff nach der Impfung zu gering ist, um einen genügenden Reiz zu starker Immunkörperproduktion auszuüben. Daher die Unterschiede zwischen den Spalten I und II und der Rückschlag bei den Normaltitern $^3/_8$ und $^1/_5$. Für die Endtiter bei den Normalwerten $^1/_{10}$ und besser müßte allerdings eine andere Erklärung gefunden werden.

Um mir ein Bild zu machen, wie stark die Adsorbierbarkeit der Normalhämolysine an die Hammelerythrozyten ist, stellte ich folgenden Reagenzglasversuch an:

0,25 ccm Blutkörperchenaufschwemmung verschiedener Dichte werden mit je 0,25 ccm inaktivierten Serums versetzt und eine Stunde bei Zimmertemperatur stehen gelassen. Die Temperaturunterschiede wurden vernachlässigt, weil die Adsorptionskonstante K der Adsorptionsformel: $x = k \cdot (c - x)^{1/n}$ bei 10° Unterschied nur um $^1/_{10}$ zunimmt. Die Röhrchen wurden dann geschleudert und die Flüssigkeit abgegossen. Diese wurde durch je 0,25 ccm NaCl-Lösung, Komplement ($^1/_{10}$ verdünnt) und 1proz. Blutkörperchenaufschwemmung auf 1,25 ccm ergänzt. Nach 20 Minuten währendem Aufenthalt im Wasserbad bei 37° C wurde abgelesen, welche Blutkörperchen-Konzentration notwendig war, um die lösenden Normalambozeptoren zu adsorbieren, d. h. soviel davon, daß der Serumtiter schlechter als $^5/_1$ wurde, denn diesem Titer entspricht die Dosierung von Serum und 1proz. Erythrozytenaufschwemmung zu gleichen Teilen. In Tabelle (V) sind sämtliche in dieser Weise vorgeprüften Kaninchen enthalten.

Wir sehen zunächst, daß nur bei ganz wenigen Individuen eine dichtere als ¼proz. Aufschwemmung zur völligen Absorption des Normalhämolysins nötig war. Die verimpfte Aufschwemmung

Tabelle V.

Immuntiter	Der Normalambozeptor wird absorbiert durch H.-Blut: Aufschwemmungen von der Konzentration					
	I 4—$^1/_2$ %	II $^1/_4$ %	III $^1/_8$ %	IV: I bis III 4 bis $^1/_8$ %	V $^1/_{16}$ %	VI $^1/_{32}$ u. $^1/_{64}$ %
1:< 1000	4	3	2	9	1	1
1:1000	1	2	1	4	6	5
1:2000	—	2	2	4	—	1
1:3000	—	—	1	1	2	7
1:4000	—	—	2	2	6	3
1:5000 u. weniger	1[1])	—	—	1	2	—

Keine rechnerisch nachweisbaren Differenzen!

1) Das betr. Kaninchen hatte einen außerordentlichen Normalambozeptortiter (200faches Serum!)

ist 20proz. Die Dosis betrug 3,5 ccm. Nehmen wir an, die Impftiere führten im Mittel 50 ccm Blutplasma im Gesamtblutkreislauf (oder 49,0 ccm zwecks bequemerer Rechnung). Das Hammelblut würde dann im Körper 15mal verdünnt, wenn wir eine rasche, gleichmäßige Verteilung annehmen, was wir auf Grund des raschen Blauwerdens pigmentloser Hautstellen bei intravenöser Verabreichung von Methylenblau wohl tun dürfen. Im Kaninchenblutkreislauf befänden sich also ca. 1⅓ Proz. Hammelerythrozyten. Da die Adsorptionsvorgänge sehr rasch verlaufen, wäre damit zu rechnen, daß sich die vollständige Adsorption des Normalantikörpers bei dem großen Ueberschuß an Adsorbens in fast allen Fällen so schnell vollzieht, daß keine wesentlichen Zeitdifferenzen im Ablauf der Reaktion in Betracht kämen. Der durch die Adsorption verursachte Reiz wäre also nicht sehr verschieden, indem in fast allen Fällen in kürzester Zeit vollkommene Bindung einträte. Nun zeigt sich aber nach Tabelle V, daß dies nicht der Fall ist, daß wenigstens der Reizerfolg ja nach der Dichte der zur Absorption der Normalhämolysine notwendigen Aufschwemmung verschieden ist. Unter den Normalseren mit hohen Absorptionsquoten ($^4/_1$ — ¼) ergab nur eines von 13 einen höheren Immuntiter als $^1/_{2500}$. Bei diesem Tier fällt der außerordentlich hohe Normaltiter auf. 7 von den 13 Tieren dieser Gruppe erzielten nur Titer unter $^1/_{1000}$. Mit fallender Dichte der zur Absorption notwendigen Hammelblutaufschwemmung steigt der Titer, besonders wenn damit ein relativ hoher Normalhämolysingehalt verbunden ist.

Ich habe in Tabelle VI die Absorptionsquote mit dem Normaltiter multipliziert und das Produkt in Tausendstel angegeben (also $^4/_1 \times {}^1/_{200} = {}^1/_{50} = {}^{22}/_{1000}$; $^4/_1 \times {}^3/_{20} = {}^3/_5 = {}^{600}/_{1000}$ usw. Diese Aufstellung ist zu rein praktischen Zwecken gemacht. Es ist also nicht etwa beabsichtigt, eine Kurve zu zeichnen, wobei der Immuntiter als vom Produkt abhängige Variable erscheint.

Das Produkt aus Normalambozeptortiter und der Dichte der zur Absorption notwendigen Erythrozytenaufschwemmung wird mit 1000 multipliziert.

Tabelle VI.

Immuntiter	Werte aus dieser Berechnung		
	0,16—25,0	31,25—93,75	100,0—1000,0
1: < 1000	1 [1])	5	5
1: 1000	3 [1])	10	2
1: 2000	1 [1])	4	—
1: 3000	4	6	—
1: 4000	4	5	2
1: 5000 und weniger	3	—	—

Keine rechnerisch nachweisbaren Differenzen!

1) 3 von diesen 5 Tieren hatten hohen Aktivtiter, die beiden anderen im Aktivvorversuch nicht geprüft.

In Tabelle VI sind die Produkte nach steigenden Werten geordnet. Als Ergebnisse hebe ich hervor, daß von den Tieren mit den Werten 0,16—25 11 von 16 den Titer 3000 überschritten, 7 von 16 erreichten 4000 und mehr. Die Gruppe 26—100 weist 11 Tiere über 3000 gegen 20 unter 3000 auf, 5 von 30 kamen auf 4000. Von den 9 Tieren mit der Produktzahl 100 und darüber wurde zwar 2mal der Titer 4000 erzielt, die anderen 7 aber kamen auf 1000 und weniger. (Die relativ wenigen hohen Titer dieses Versuches sind damit zu erklären, daß ich damals gerade wenig Tiere meiner erfolgreichsten Blutlinie zur Verfügung hatte, dagegen eine Reihe von Nachkommen schlecht vererbender Väter.) Ich habe die Mittelwerte der Spalten 1 und 2 verglichen, konnte aber eine reelle Differenz nicht nachweisen. Die Mittelwerte sind 3343,75 und 2080,0. Die Differenz 1263,75 ± 479,13. Der mittlere Fehler beträgt also nicht viel mehr als ein Drittel.

Die je nach dem Normaltiter und nach der Adsorbierbarkeit der vorhandenen Lysine an die roten Blutkörperchen verschiedenen Ergebnisse sowie die Tatsache, daß gleich vorgeprüfte Tiere unterschiedliche Immuntiter erreichten, hießen mich nachprüfen, ob

vielleicht die Veränderungen des Antigens im Blute des Kaninchens eine besonders wichtige Rolle spielen. Wiederum wurde ein Reagenzglasversuch angesetzt. Die Berechtigung sollte sich praktisch erweisen. Immerhin hatte ich Vorbilder genug aus den Untersuchungen über die Blutgruppen des Menschen und der Tiere. Aktives Serum wurde in fallender Konzentration mit gleichen Dosen ¼proz. Hammelbluts zusammengebracht. Die Mischung blieb über Nacht stehen. Am nächsten Tag wurde abgelesen.

Tabelle VII.

Immuntiter	Aktivtiter (Lösung oder Agglut.) vor der Impfung		
	$^1/_1$—$^1/_4$	$^3/_{16}$—$^1/_8$	$^1/_{16}$ und weniger
1:< 1000	—	1	7
1:1000	2 [1])	4	3
1:2000	1	1	4
1:3000	4	5	1
1:4000	5	3	—
1:5000 weniger	1	—	—

Keine rechnerisch nachweisbaren Differenzen!

1) die Normalambozeptortiter eines dieser beiden Tiere war $> {}^5/_1$.

Die beschriebene Vorprüfung mit aktivem Serum konnte ich nur bei 42 Tieren durchführen. Das Resultat ist in Tabelle VII wiedergegeben. Aus dem Vorversuch konnte mit einer gewissen Sicherheit auf den späteren Immuntiter geschlossen werden, wenigstens was die am Tabellenanfang und -ende liegenden Werte betrifft. Wenn wir nochmals die Tabelle VI betrachten, so werden 3 von den 5 Titern unter 3000 bei der 1. Gruppe ohne weiteres erklärt. Hohe aktive Hämolysenwerte und besonders hohe Normalagglutinintiter verhinderten den gewünschten Impferfolg. Es ist zu beachten, daß bei gleichen Inaktivtiter oft ganz verschiedene Aktivwerte festgestellt wurden, was jedenfalls auf verschiedenen Komplementgehalt zusückzuführen ist (eine Prüfung konnte ich nicht vornehmen). Es stieg aber doch mit dem Gehalt an Normalambozeptor im allgemeinen auch der Aktivtiter, und daher kommt es wohl zum Teil, daß die Auswahl der Tiere mit hohen inaktiven Normalwerten nur bis zu einer gewissen Grenze Erfolg brachte. Bei allen Prüfungen besonderer Impfverfahren wäre also darauf zu achten, ob durch die Präparation der Versuchstiere der Komplementgehalt und damit der Aktivtiter herabgesetzt werden. Vielleicht wird der Grenzwert dann beim vorliegenden Impfmodus von einer größeren Anzahl von Tieren überwunden werden. Der

Grenzwert kann aber auch in der Anlage zur Antikörperbildung begründet sein.

Eine vorsichtige Deutung des letzten Ergebnisses lautet dahin, daß die rasche Auflösung des Hammelblutes bzw. dessen Agglutination hemmend auf die Immunhämolysinbildung wirkt. Im Zusammenhang damit erwähne ich, daß die bei den letzten Impfungen (bei der 2. oder 3. Einspritzung) auftretenden Todesfälle nur Kaninchen mit hohen Aktivwerten betrafen (Lösungstiter $^1/_{16}$, $^1/_{16}$, $^1/_{80}$ Agglut. Titer $^1/_{32}$ Spur, $^1/_{32}$, $^1/_{32}$, $^1/_{50}$, $^1/_{120}$, $^1/_{400}$). An einen schädigenden Einfluß auf die Antikörperproduktion muß also unbedingt gedacht werden, z. B. an Schädigung durch artfremdes Hämoglobin (Landsteiner hat die Unterschiede des Hämoglobins der verschiedenen Tiergattungen nachgewiesen), oder z. B. an Störungen infolge von Verstopfung von Gefäßen durch Konglomerate agglutinierter Bakterien.

Nach Sahlis Theorie aber lautet die Erklärung so: Je rascher die Oberfläche durch Lösung oder Agglutination verändert wird, desto geringer sind Reiz und Reizerfolg. Man kann einwenden, daß das Forssmansche Antigen, das auch in den Hammelerytrozyten vorhanden ist, lipoidlöslich ist, bei seiner Anwendung also nur Vorgänge im mikroheterogenetischen System in Frage kommen, wenn wir die Anwesenheit der eigenen zelligen Bestandteile im Blute des Impftieres vernachlässigen. Aber es können doch gleiche Reaktionen auf verschiedene Weise ausgelöst werden.

Ich will nun zum Ausgangspunkt zurückkehren, zum Vererbungsversuch: Bei planmäßiger Züchtung sind nach meinen Ergebnissen erwünscht: Hoher Inaktivtiter, starke relative Adsorbierbarkeit der Normalhämolysine, geringer Komplementgehalt, Fehlen von Agglutininen. Aussichtsreich erscheinen die Züchtung auf Komplementmangel, nachdem F. A. Rich und Downing sowie Hyde (zit. nach 1) berichten, daß Komplementmangel bei Meerschweinchen als rezessives also erblich verursachtes Merkmal festgestellt wurde, ferner die Züchtung auf Agglutininmangel, da die von mir beobachteten Fälle mit nachweisbaren Hämagglutininen alle solche Kaninchen betreffen, welche aus 2 bestimmten Blutlinien stammen. Alle diese Merkmale wirken aber wahrscheinlich nur modifizierend mit bei der Auswirkung der Erbanlage zur Immunkörperbildung, welche in den Zellen konstitutionell begründet ist.

Zusammenfassung.

a) Beim angewandten Impfmodus zeigen sich 2 Reaktionsnormen, welche ungefähr bei den Titern $^1/_{1000}$ und $^1/_{4000}$ liegen.

b) Die Anlage zur Immunhämolysinbildung erwies sich insofern als vererbbar, als es gelang, die Zahl der Minusvarianten durch planmäßige Züchtung erheblich zu verringern zugunsten der dem erwünschten Reaktionstyp zugehörigen Gruppe. Die Zuchtwahl brachte aber nur innerhalb einzelner Blutlinien Erfolg.

c) Der Gehalt des inaktivierten Serums an Normalhämolysinen kann nur in beschränktem Maße bei der Auswahl der Impftiere dienlich sein. Immerhin eigneten sich bei meinen Versuchen die Kaninchen mit den höchsten Normaltitern fast alle, die mit den niedrigsten nur in geringer Zahl.

d) Mit dem inaktiven Normaltiter steigt im allgemeinen die lytische Wirkung des aktiven Serums, damit auch die des Plasmas des Impftieres. Ein hoher aktiver Normalhämolysintiter, noch mehr aber das Vorhandensein von Hämagglutininen erwiesen sich als hemmend bei der Immunhämolysinbildung.

e) Die antigenen Eigenschaften der Hammelerythrozyten waren umso wirksamer, je länger deren adsorbierende Oberfläche im Körper des Impftieres unverändert erhalten blieb.

Literatur.

1) H. Braun, K. Hofmeier und G. v. Holzhausen, im Handbuch der pathog. Mikroorganismen von Kolle, Kraus und Uhlenhuth, Bd. 1, S. 1109.
2) H. und L. Hirszfeld, Zeitschr. f. Immunitätsf. u. exp. Ther., Bd. 54, S. 81.
3) Paul A. Lewis and D. Loomis, Journ. of exp. med., Vol. 47, p. 437.
4) F. Wolf, Zeitschr. f. Immunitätsf. u. exp. Therapie, Bd. 14, p. 668.
5) R. Bieling, im Handbuch d. pathog. Mikroorganismen.
6) St. Baecher, Zeitschr. f. Immunitätsf. usw., Bd. 55, S. 185.
7) W. Doelter, ebenda usw., Bd. 43, S. 95.
8) L. Hirszfeld und W. Halber, ebenda usw., Bd. 53, S. 419.
9) E. Witebsky, ebenda usw., Bd. 59, S. 139.
10) Hahn und Neu, ebenda usw., Bd. 29, S. 349.

Anhang.

Nach Abschluß der vorliegenden Arbeit wurden die Versuche über den Zusammenhang zwischen normalem Aktivtiter und Hämolysintiter nach der Impfung fortgesetzt. Die Ergebnisse sind der Tabelle VIII zu entnehmen.

Tabelle VIII.

Hämolysintiter nach der Impfung	Aktivtiter I L oder A bis $^1/_4$	II L oder A von $^1/_{16}$ ab	III Aggl. insgesamt	IV Aggl. von $^1/_8$ ab	V L bis $^1/_4$	VI L von $^1/_{16}$ ab
< 1000	1 Tier	12 Tiere	9 Tiere	9 Tiere	1 Tier	6 Tiere
1000	2 Tiere	7 „	6 „	6 „	2 Tiere	4 „
2000	2 „	8 „	3 „	2 „	1 Tier	6 „
3000	7 „	7 „	4 „	3 „	6 Tiere	6 „
4000	11 „	0 „	2 „	0 „	9 „	0 „
5000 u. höher	3 „	1 Tier	1 Tier	0 „	2 „	1 Tier
unter 2000	11,54 % (± 6,266)	54,29 % (± 8,420)	60,00 % (± 8,798)	75,00 % (± 9,682)	14,28 % (± 4,815)	43,48 % (±10,348)
3000 u. höher	80,77 % (± 7,729)	22,86 % (± 7,098)	35,00 % (± 9,539)	15,00 % (± 7,984)	80,95 % (± 8,188)	30,43 % (± 9,594)
4000 u. höher	53,85 % (± 9,445)	2,86 % (± 2,817)	12,00 % (± 6,499)	0,00 %	52,36 % (±10,899)	4,35 % (± 4,253)

L = Lösung; A und Aggl. = Agglutination.

Vergleicht man die Zahlen der Spalten I und II, so erhält man lauter reelle Differenzen:

54,29 % — 11,54 % = 43,25 % ± 10,50 % (unter 2000)
80,77 % — 22,86 % = 57,91 % ± 10,49 % (über 3000)
53,85 % — 2,86 % = 50,99 % ± 9,86 % (über 4000)

Da aber aus den Spalten III und IV klar hervorgeht, daß hauptsächlich die Agglutination der Erythrozyten eine Hemmung der Hämolysinbildung verursacht, wurden in Spalte V und VI nur solche Tiere verglichen, bei denen keine Normalagglutinine festgestellt wurden. Der ungünstige Einfluß einer raschen Hämolyse ist nur insofern nachweisbar, als die Differenzen

52,36 % — 4,35 % = 48,01 % ± 11,70 % (über 4000)
und 80,95 % — 30,43 % = 50,52 % ± 12,61 % (über 3000)

reell sind. Daß aber bei hohem Gehalt an Normallysinen Immunitätstiter unter 2000 besonders häufig sind, kann nicht als exakt bewiesen gelten. Die Differenz 43,48 Proz. — 14,28 Proz. = 29.70 Proz. hat den mittl. Fehler ± 12,85 Proz. Es müßte also diesbezüglich noch mehr Material gesammelt werden.

Aufsichtsrat und Direktion der Pharmagans A.-G. Oberursel bin ich zu großem Dank verpflichtet, daß sie mir die Durchführung dieser Arbeit ermöglichten, ebenso Herrn o. Univ.-Prof. Dr. W. Ernst-München für das entgegengebrachte Interesse.

Lebenslauf.

Ich, Karl Franta, Sohn des Hauptschriftleiters Johann Bapt. Franta und seiner Ehefrau Maria Magdalena, wurde am 21. September 1893 zu München geboren. Dort besuchte ich die Volksschule und das Wilhelmsgymnasium. 1912 begann ich das tierärztliche Studium an der Tierärztlichen Hochschule zu München. Ostern 1914 bestand ich die tierärztliche Vorprüfung. 1915 trat ich in den Heeresdienst, den ich 1919 als Vet. d. Res. verließ. Einen kurzen Aufenthalt in der Heimat benutzte ich zur Erlangung der Approbation (August 1917). Oktober 1919 bestand ich die amtstierärztliche Prüfung in Bayern.

Bis Mai 1920 in der Praxis tätig, praktizierte ich bis Oktober 1921 Landwirtschaft, zuletzt im Staatsgut Grub bei München. November 1921 bestand ich die Prüfung für den staatlichen Tierzuchtdienst in Bayern. Ich war dann 2 Jahre Assistent am Institut für Tierzucht der Universität München. Im Herbst 1923 begann ich das Studium der Volkswirtschaftslehre und eine embryologisch-histologische Arbeit am Tieranatomischen Institut zu München. Beides mußte ich unterbrechen. 1925 war ich dann 7 Monate lang wissenschaftlicher Hilfsarbeiter an der Bayr. Veterinärpolizeilichen Anstalt Oberschleißheim, anschließend als bakteriologischer Assistent bei Dr. R. Zimmermann in Königsberg. Seit 1. Mai 1926 bin ich Angestellter der Pharmagans A.-G. Oberursel (Taunus).

Frommannsche Buchdruckerei (Hermann Pohle) in Jena.